ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2000
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z. 45 Nr kol. 1487

Katarzyna LISOWSKA, Jerzy DŁUGOŃSKI

Uniwersytet Łódzki, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

CUNNINGHAMELLA ELEGANS JAKO GRZYB PRZEKSZTAŁCAJĄCY STEROIDY I ROZKŁADAJĄCY UCIĄŻLIWE KSENOBIOTYKI

Streszczenie. W pracy badano możliwość wykorzystania drobnoustrojów stosowanych do produkcji leków steroidowych w ochronie środowiska. Stwierdzono, że szczep *Cunninghamella elegans* IM 1785/21Gp aktywny w procesie biotransformacji steroidów, jest zdolny do degradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Wykazano, że badany szczep grzybów eliminuje w 96-98% fenantren, w stężeniu 250 mg/l, na podłożu Sabouraud, po 7 dniach inkubacji (hodowla w kolbach) i po 3 dniach inkubacji (hodowla w bioreaktorze o pojemności całkowitej 42 l).

CUNNINGHAMELLA ELEGANS AS A FUNGUS CAPABLE OF TRANSFORMING STEROIDS AND DEGRADING HARMFUL XENOBIOTICS

Summary. The application of microorganisms, used to steroid drug production, in the environmental protection was studied in this work. It was shown, that *Cunninghamella elegans* IM 1785/21Gp used to steroid transformation, was able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. It has been found that this strain eliminated phenanthrene in 96-98% in the concentrations 250 mg/l, on Sabouraud medium, after 7 days of incubations (flask cultivation) and after 3 days of incubations (bioreactor cultivation).

WPROWADZENIE

Rozwój przemysłu, szczególnie petrochemicznego i chemicznego, spowodował zanieczyszczenie środowiska produktami powstającymi w wyniku przeróbki ropy naftowej, w skład których wchodzą między innymi wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). WWA są związkami hydrofobowymi, a ich trwałość w ekosystemach jest zależna głównie od ich niskiej rozpuszczalności [1]. Degradacja mikrobiologiczna jest jednym z głównych sposobów usuwania WWA ze środowiska (oczyszczanie osadów i powierzchni

gleby). W wielu pracach dotyczących degradacji WWA akcentuje się szczególne uzdolnienia grzybów w tym zakresie. Przyczyną tego zainteresowania są m.in. pozakomórkowe wydzielanie wielu enzymów uczestniczących w degradacji, duża tolerancja na wysokie stężenia substancji toksycznych, różnorodność dróg metabolicznych, niska specyficzność enzymów. W literaturze podkreśla się znaczenie grzybów strzępkowych, w tym *Cunninghamela elegans* w procesach degradacji WWA. Szczepy *C. elegans* opisywane w literaturze zdolne są do utleniania potencjalnie rakotwórczych WWA do metabolitów będących produktami detoksykacji np. nitrofluorantenu [6], 6-nitrochrysenu [7], naftalenu, antracenu, fenantrenu, acenaftenu, fluorantenu, pirenu, benz(a)antracenu, benzo(a)pirenu [2].

W procesach rozkładu weglowodorów aromatycznych bierze udział cytochrom P-450, będący składnikiem monooksygenaz, które odpowiadają za wprowadzenie jednego atomu tlenu cząsteczkowego do pierścienia aromatycznego [3]. Cytochrom P-450 jest także związany z biotransformacją związków steroidowych, m.in. jest zaangażowany w 11-hydroksylację korteksolonu u *Cunninghamella elegans* [5, 3]. W procesie hydroksylacji korteksolonu otrzymuje się hydrokortyzon i jego pochodne stosowane jako leki przeciwalergiczne, przeciwreumatoidalne i przede wszystkim przeciwzapalne. W Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UŁ wyizolowano z gleby szereg szczepów grzybów strzępkowych, w tym również *C. elegans* IM 1785/21Gp, zdolnych do transformacji steroidów oraz degradacji WWA [5, 4]. Stwarza to możliwość zarówno pozyskania szczepów, które mogłyby być wykorzystane w bioremediacji, jak i może stanowić dogodny model badawczy do wyjaśnienia zależności pomiędzy hydroksylazami steroidowymi a układami enzymatycznymi odpowiedzialnymi za rozkład WWA.

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki

Fenantren i steroidy: korteksolon, epihydrokortyzon, hydrokortyzon otrzymano z firm Sigma i Aldrich. Rozpuszczalniki organiczne pochodziły z J.T. Baker, Serva i POCh. Wszystkie odczynniki posiadały najwyższy stopień czystości. Roztwór wyjściowy fenantrenu wykonano w DMF w stężeniu 12,5 mg/ml, steroidy rozpuszczano na gorąco w etanolu, aby uzyskać końcowe stężenie w hodowli 1-2%.

Biotransformacja steroidów

Namnożonej na skosach Sabouraud grzybni *C. elegans* IM 1785/21Gp używano do zaszczepienia 20 ml płynnego podłoża Sabouraud z dodatkiem korteksolonu (500 mg/l). Hodowlę inkubowano 7 dni w temp. 28°C. Całość hodowli ekstrahowano octanem etylu. Ekstrakty odwadniano bezwodnym siarczanem sodu, sączono i odparowywano na wyparce próżniowej. Analizę stopnia ubytku korteksolonu i powstałych produktów transformacji: hydrokortyzonu i epihydrokortyzonu przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego Hewlett Packard HP 1100 sprzężonego z detektorem UV-VIS na kolumnie kapilarnej ODS Hypersil (5μm x 125 x 4 mm). Warunki analizy: temp. 40°C, przepływ 1 ml/min, długość fali 242 nm, faza mobilna metanol/woda 50:50.

Biodegradacja fenantrenu

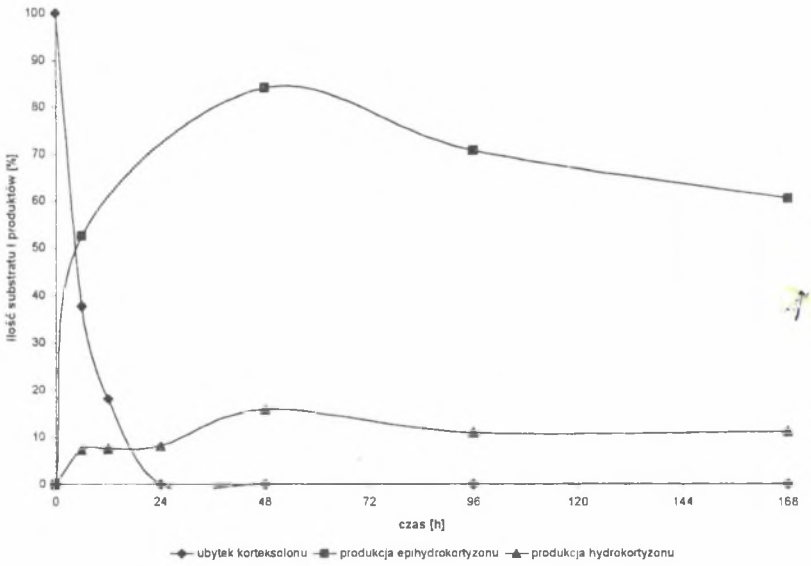
C. elegans IM 1785/21Gp namnażano na skosach Sabouraud (7-10 dni w temp. 28°C). Namnożonej grzybni używano jako inokulum do zaszczepienia 20 ml płynnego podłoża Sabouraud z dodatkiem fenantrenu w stężeniu 250 mg/l. Po 7 dniach inkubacji w temp. 28°C, hodowle sączono i przemywano w celu oddzielenia podłoża od grzybni. Grzybnię rozbijano w dezintegratorze ultradźwiękowym firmy Misonix (Anglia). Zarówno grzybnię, jak i podłoże ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu, odwadniano bezwodnym siarczanem sodu, sączono i odparowywano na wyparce próżniowej w temp. 40°C. Analizę stopnia ubytku substratu przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego firmy Hewlett-Packard typ HP 6890 sprzężonego z detektorem masowym HP 5973, na kolumnie kapilarnej HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25μm). Analiza była prowadzona w programowanym przyroście temperatury 110-250°C, przy wzroście temperatury 20°C/min.

Biodegradację prowadzono także w fermentorze o objętości całkowitej 42 l. Inokulum (20%) stanowiła namnożona 24 h grzybnia *C. elegans*.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badanie biotransformacji korteksolonu przez szczep *C. elegans* IM 1785/21Gp

Zdolność biotransformacji korteksolonu (500 mg/l) przez badany szczep przedstawiono na rysunku 1.

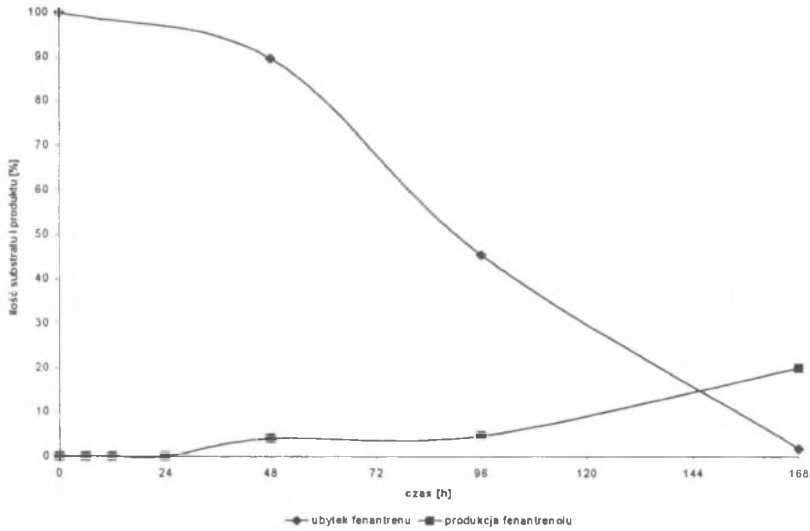


Rys.1. Biotransformacja korteksolonu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp
Fig. 1. Cortexolone biotransformation by *C. elegans* IM 1785/21Gp

Stwierdzono, że podczas 7-dniowej inkubacji, *C. elegans* IM 1785/21Gp transformuje korteksolon do hydrokortyzomu i epihydrokortyzonu. Znaczny ubytek korteksolonu (63,2%) obserwowano już po 6 h hodowli, a po 24 h substrat został całkowicie zmetabolizowany. Ilość powstałego epihydrokortyzonu po 24 h inkubacji wynosiła 84,1%, a hydrokortyzonu 15,9%.

Degradacja fenantrenu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp

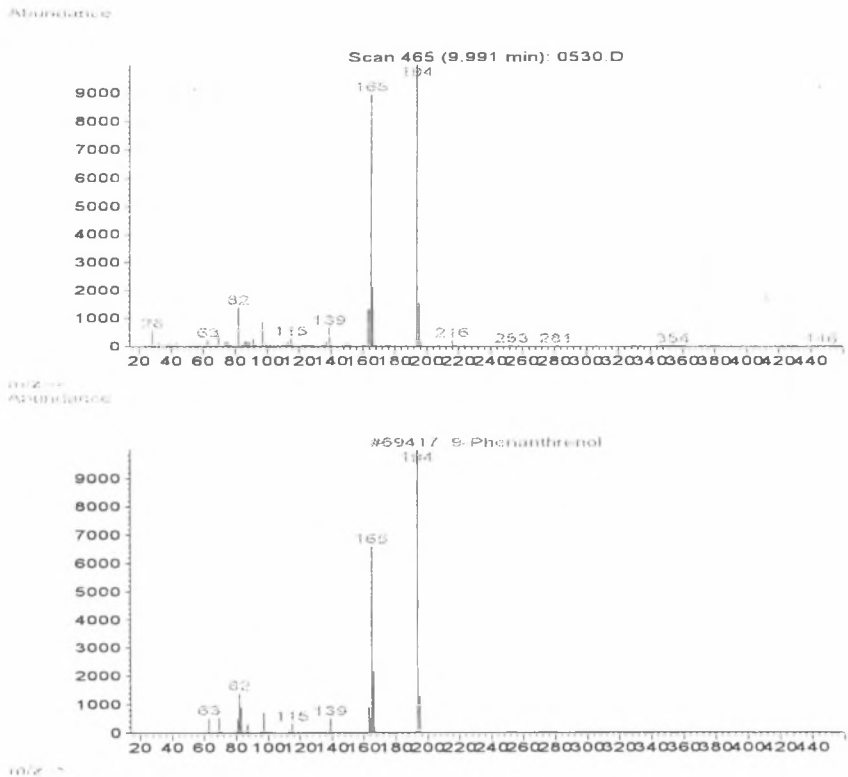
Wyniki przedstawiono na rysunku 2. Zawartość substratu oznaczono w podłożu pohodowlanym i w grzybni, po uprzedniej dezintegracji.



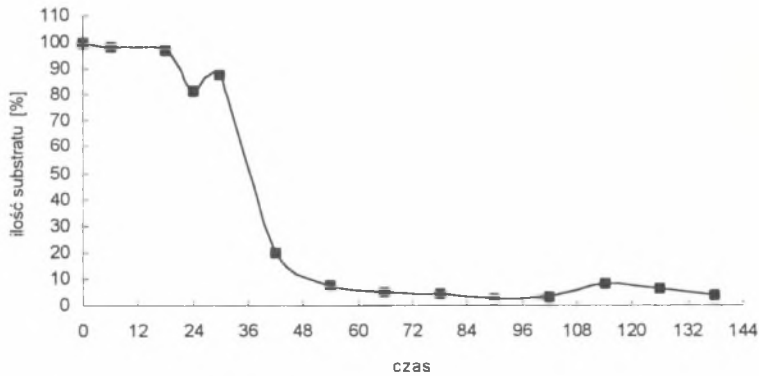
Rys. 2. Degradacja fenantrenu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp
Fig. 2. Phenanthrene degradation by *C. elegans* IM 1785/21Gp

Stwierdzono, że szczep *C. elegans* IM 1785/21Gp jest zdolny do całkowitego rozkładu fenantrenu. Po 7 dniach inkubacji ilość pozostałego fenantrenu wynosiła 4%. Jednocześnie po upływie 24 h zaobserwowano pojawienie się metabolitu o czasie retencji 9.991, powstałego w wyniku degradacji fenantrenu. Na podstawie biblioteki GC/MS zidentyfikowany został jako 9-fenantrenol (rys. 3). Po 7 dniach inkubacji ilość fenantrenolu wynosiła 20%.

Przebieg degradacji fenantrenu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp w fermentorze (42 l) przedstawiono na rysunku 4. Stwierdzono znaczne przyspieszenie procesu eliminacji tego substratu. Po 72 h inkubacji ilość zdegradowanego fenantrenu wynosiła 98%.



Rys. 3. Widmo masowe badanego metabolitu (czas retencji 9.991) i 9-fenantrenolu
Fig. 3. Mass spectra of compound formed from phenanthrene by *C. elegans* IM 1785/21Gp (retention time 9.991) and 9-phenanthrenol



Rys. 4. Degradacja fenantrenu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp w fermentorze 42 l
Fig. 4. Phenanthrene degradation by *C. elegans* IM 1785/21Gp in fermentor cultivation (42 l)

WNIOSKI KOŃCOWE

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że szczep *C. elegans* IM 1785/21Gp jest zdolny zarówno do przekształcania steroidów, jak i wykazuje dużą aktywność degradacyjną w stosunku do węglowodorów aromatycznych. Stwarza to potencjalne możliwości wykorzystania drobnoustrojów stosowanych do produkcji leków steroidowych w ochronie środowiska. Biomasa uzyskiwana w przemysłowych procesach transformacji steroidów (stanowiąca kłopotliwy odpad dla zakładów farmaceutycznych) może stanowić materiał wyjściowy w procesach bioremediacyjnych. Jednakże aby móc stosować szczepy drobnoustrojów do bioremediacji w sposób kontrolowany, niezbędne jest wyjaśnienie mechanizmów enzymatycznych występujących u grzybów strzępkowych i czynników zwiększających podatność WWA na detoksykację. Badania z tego zakresu są kontynuowane w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UŁ.

LITERATURA

1. Cerniglia C.E.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368, 1992.
2. Cerniglia C.E., Sutherland J.B., Crow S.A.: Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. Winkelmann G. (ed.) Microbial degradation of natural products. VCH 7: 194-217, 1992.
3. Zhang D., Yang Y., Leakey A.E.J., Cerniglia C.E.: Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. FEMS Microbiol. Lett. 138: 221-226, 1996.
4. Lisowska K., Długoński J.: Removal of anthracene and phenanthrene by filamentous fungi capable of cortexolone 11-hydroxylation. J. Basic Microbiol. 39: 117-125, 1998.
5. Długoński J., Bartnicka K., Zemełko I., Chojecka V., Sedlaczek L.: Determination of cytochrome P-450 in *Cunninghamella elegans* intact protoplasts and cell free preparations capable of steroid hydroxylation. J. Basic Microbiol. 31: 347-356, 1991.
6. Pothuluri J. V., Doerge D. R., Churwell M. I., Fu P. P., Cerniglia C. E.: Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. J. Toxic. Environ. Health. 53(2): 153-74, 1998a.
7. Pothuluri J. V., Sutherland J. B., Freeman J. P., Cerniglia C. E.: Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. Appl. Environ. Microbiol. 64(8): 3106-9, 1998b.

Abstract

The filamentous fungi play an important role in utilization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and related compounds found in the environment. Since some of this compounds ae very harmful and carcinogenic, the isolation and investigation of microorganisms which are useful in the detoxification and utilization of these pollutants are of crucial importance. Intracellular mechanisms of PAHs degradation are very often combined with cytochrome P-450 enzymes activity. Fungal cytochromes P-450 operate also as monooxygenases components, which are responsible for steroids transformation. In our Department a number of filamentous fungal strains were used for the investigation of the mechanisms of cortexolone 11-hydroxylation. Hydroxylation and degradation of both types of lipophilic substrates (steroids and PAHs) by microorganisms with significant transformation

and utilization activity are in the centre of interest of modern biotechnology. In this work the application of microorganisms used to steroid drug production in the environmental protection was studied. It was shown that *Cunninghamella elegans* IM 1785/21Gp strain, used to steroid transformation, was able to degrade PAHs. It has been found that this strain eliminated phenanthrene in 96-98% in the concentrations 250 mg/l, after 7 days of incubations (flask cultivation) and after 3 days of incubations (fermentor cultivation). This fact creates the possibility of applying microorganisms used for steroid production in bioremediation.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach programu Unii Europejskiej INTERCOPERNICUS. Temat grantu: „Biodegradation of Toxic Organic Compounds in Waste Water and Accumulation of Heavy Metals", PL964126, contract IC15 CT 96-0716.

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch